

氏 名	趙 虹
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 4659 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation (STAT3 転写活性化ドメイン内の 752-761 領域は、Ser727 リン酸化と転写コアクチベーターSRC-1 の動員に必須である)
論文審査委員	主 査 教 授 中 嶋 弘 一 副主査 教 授 森 田 隆 副主査 教 授 岩 井 一 宏

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】種々のサイトカイン、増殖因子により活性化される転写因子 STAT3 は免疫系、造血系だけでなく様々な細胞の癌化にも関与している。STAT3 による遺伝子転写活性化の機序を明らかにするため、高度に保存された転写活性化ドメイン中の 752-761 領域の役割を解析した。

【方法】RNAi 法を用いて、*stat3*発現をノックダウンしたヒト HepG2 細胞株(STAT3-KD)を作製した。STAT3-KD に、野生型又は転写活性領域に変異を加えた種々のマウス STAT3 [STAT3 野生型(1-770, WT)、C 末端欠変異体 STAT3-761(761)、STAT3-750(750)、Leu755 と Phe757 を Ala に置換した STAT3-LFAA(LFAA)] を導入し、STAT3 再構成安定発現細胞株を作製した。一過性に導入するレポーターアッセイ、ウエスタンブロット法による標的遺伝子発現測定により転写活性化能を検討した。また、クロマチン免疫沈降法を用いて転写開始複合体形成を解析した。

【結果】各 STAT3 再構成細胞株の STAT3 発現量と IL-6 刺激後の Tyr705 のリン酸化は同程度であった。IL-6 刺激による *junB* の発現は、WT、761 と比較して 750、LFAA では低下していた。また、750 のみ、IL-6 刺激による Ser727 リン酸化が認められなかった。*junB* 遺伝子プロモーター上の転写開始複合体形成を検討したところ、WT、761 では、STAT3 依存的に p300 及び SRC-1 の動員、ヒストン H3、H4 のアセチル化、十分な RNA ポリメラーゼ II の動員が認められたが、750 と LFAA では、p300 の動員と H4 のアセチル化は正常に起るが、SRC-1 の動員、H3 Lys14 のアセチル化は認められなかった。SRC-1 の共発現により WT による転写は増強されたが、LFAA の活性は増強されなかった。

【結論】STAT3 転写活性化ドメイン中の保存された領域 752-761 は、IL-6 刺激による STAT3 Ser727 のリン酸化、HAT 活性をもつ SRC-1 の動員に重要であること、後者には特に Leu755、Phe757 が必須であることが明らかとなった。また、変異型 STAT3 を再構成する種々の細胞株を用いることにより、転写活性化領域の *in vivo* 機能解析が可能であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

種々のサイトカイン、増殖因子により活性化される転写因子 STAT3 は免疫系、造血系の増殖分化だけでなく様々な細胞の癌化にも関与している。STAT3 による遺伝子転写活性化の機序の一端を明らかにするため、高度に保存された転写活性化ドメイン中の 752-761 領域の役割を解析した。RNAi 法を用いて、*stat3*発現をノックダウンしたヒト HepG2 細胞株(STAT3-KD)を作製した。STAT3-KD に、野生型又は転写活性領域に変異を加えた種々

のマウス STAT3 [STAT3 野生型(1-770, WT)、C 末端欠失変異体 STAT3-761、STAT3-750、Leu755 と Phe757 を Ala に置換した STAT3-LFAA] を導入し、STAT3 再構成安定発現細胞株を作製した。各 STAT3 再構成細胞株の STAT3 発現量と IL-6 刺激後の Tyr705 のリン酸化レベルはほぼ同等であった。IL-6 刺激による JunB の発現誘導は、STAT3-WT、STAT3-761 と比較して STAT3-750、STAT3-LFAA では大きく低下していた。また、STAT3-750 のみ、IL-6 刺激による Ser727 リン酸化が認められなかった。クロマチン免疫沈降法により *junB* 遺伝子プロモーター上の転写開始複合体形成を検討したところ、STAT3-WT、STAT3-761 では、STAT3 依存的に p300 及び SRC-1 の動員、ヒストン H3、H4 のアセチル化、十分な RNA ポリメラーゼ II の動員が認められたが、STAT3-750 と STAT3-LFAA 変異体では、p300 の動員と H4 のアセチル化は正常に起るものの、SRC-1 の動員、H3 Lys14 のアセチル化は認められなかった。さらに SRC-1 の共発現により STAT3-WT による転写は増強されたが、STAT3-LFAA の活性は増強されなかった。以上のことは、STAT3 転写活性化ドメイン中の保存された領域 752-761 が、IL-6 刺激による STAT3 Ser727 のリン酸化、HAT 活性をもつ SRC-1 の動員に重要であること、後者には特に Leu755、Phe757 が必須であることを示している。

本研究は、種々の変異型 STAT3 再構成株を用いることにより STAT3 の転写活性化ドメインに保存された領域の役割を明らかにしたものである。本研究において用いられた解析法は、転写因子領域の *in vivo* 機能解析法としても汎用性のある優れたものと判断された。

よって本研究者は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。